

DER NITROBLAUTETRAZOLIUMTEST DER GRANULOZYTEN BEI FRÜH-
UND NEUGEBORENEEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER
SEPSIS

Günter Steinebach

1974

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr.von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. Klaus BETKE

DER NITROBLAUTETRAZOLIUMTEST DER GRANULOZYTEN BEI FRÜH-
UND NEUGEBORENEEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER
SEPSIS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Günter Steinebach

Garmisch 1974



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Betke

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.6.74

I N H A L T :

Seite

I. Einleitung:	
Prinzip des NBT-Tests	1
Aufgabenstellung der Arbeit	3
II. Material:	
1. Verwendete Reagenzien	5
2. Herstellung der NBT-Lösung und ihre Aufbewahrung	5
3. Blutgewinnung	5
III. Methode:	
1. Durchführung des Tests	6
a. Abnahme von Blut	6
b. Inkubation mit NBT und Pufferlösung	6
c. Blutausstriche und Färbung	6
d. Auszählung	7
2. Kontrolluntersuchungen	
a. Blindversuche	7
b. Kontrolle alter Präparate	9
3. Überprüfung, wie lange Blut für den Test verwendbar ist	11
IV. Ergebnisse eigener Untersuchungen:	
1. Patientengruppen die untersucht wurden	13
2. Übersicht der gewonnenen Werte	14
3. Vergleich der gewonnenen Werte in der ersten Lebenswoche der Kinder mit Erwachsenen	15
4. Verläufe der NBT-Werte bei Unterteilung der untersuchten Kinder nach Lebensalter in Wochen von der ersten bis zur sechsten Woche	17
5. Sepsisverläufe	18
6. Der NBT-Test bei Patienten mit Verbrennungen	21

V. Diskussion:	
1. Verwendungsmöglichkeiten des NBT-Tests	23
2. Der NBT-Test bei verschiedenen Erkrankungen	23
3. Eigene Kritik zum NBT-Test	24
4. Der NBT-Test bei Früh- und Neugeborenen	25
5. NBT-Test und Stoffwechsel	25
6. Mechanismus der NBT-Reduktion	26
7. NBT-Test bei Anwendung verschiedener Medikamente wie Corticoiden, Phenylbutazon, Antibiotika	27
8. Eigene Untersuchungen bei Anweendung von Antibiotika bei Früh- und Neugeborenen	27
9. Eigene Ergebnisse im Vergleich mit denen anderer Autoren	29
10. NBT-Test und Sepsis	31
VI. Zusammenfassung:	33
VII. Literaturverzeichnis:	35
Lebenslauf	40

E I N L E I T U N G :

Eine wesentliche Eigenschaft der Granulozyten ist die Fähigkeit zur Phagozytose und zum Abbau der phagozytierten Substanzen. Die Vorgänge, die mit dem Abbau verknüpft sind, hat man nur teilweise aufklären können. Es ist jedoch bekannt, daß der Sauerstoffverbrauch der Granulozyten dabei ansteigt (4). Ferner weiß man, daß NADH und NADPH entstehen (12,27). Das Letztere resultiert aus einer Aktivierung des Hexosemonophosphatweges (auch Pentosephosphatweg genannt) unter Verbrauch von Sauerstoff und Glukose als Energielieferanten und Produktion von Hydrogenperoxyd (4). Dieses ist gemeinsam mit den lysosomalen Enzymen verantwortlich für das Abtöten von Bakterien.

Unter den besprochenen Stoffwechselvorgängen ist die Bildung von NADH praktisch wichtig, weil sie leicht nachgewiesen werden kann. Wenn man den Redoxfarbstoff Nitroblautetrazolium (NBT), eine gut lösliche gelbe Substanz zusetzt, wird dieser in einem durch die NADH-Oxidase katalysierten Prozess zu violettsschwarzem Formazan reduziert. Dieses ist unter dem Mikroskop in den NBT-positiven Granulozyten als schwarzer, körniger Niederschlag sichtbar (Abb. 2).

Das Prinzip des NBT-Tests zeigt Abbildung 1.

Von Baehner und Mitarbeiter (2, 3) wurde 1967 der NBT-Test als Funktionsprobe der neutrophilen Granulozyten eingeführt. Sie ließen in vitro Stärke- oder Latexpartikel unter gleichzeitiger Anwesenheit von NBT phagozytieren und fanden bei normalen Granulozyten neben dem phagozytierten Material die schwärzlichen Formazan-niederschläge. Bei Granulozyten von Patienten mit septischer Granulomatose blieb die NBT-Reduktion aus. Schon vorher war bekannt, daß bei dieser Erkrankung Bakterien trotz funktionierender Phagozytose überleben. Die Unfähigkeit, NBT zu reduzieren war abgesehen davon, daß damit ein definierter Stoffwechsel-

Abbildung 1 : Prinzip des NBT-Tests

1. Prinzip

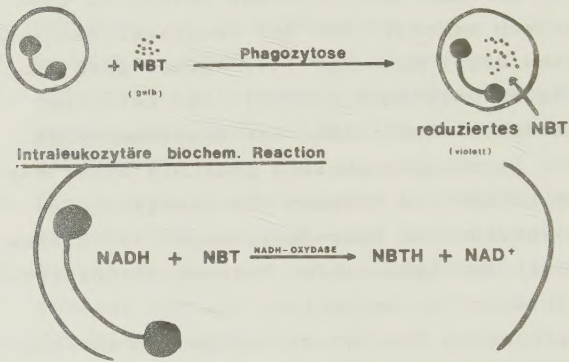
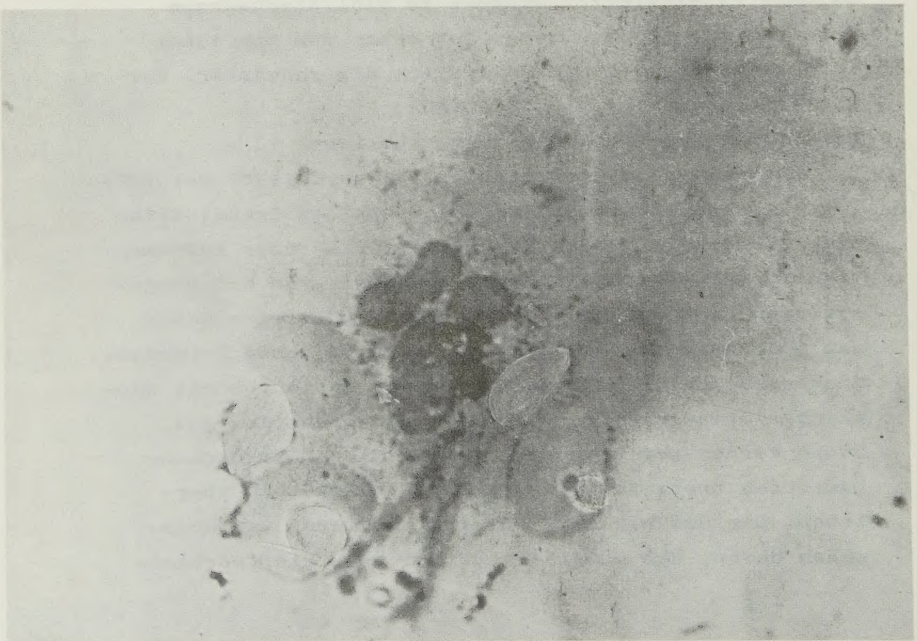


Abbildung 2 : NBT-positive Zelle



defekt als Ursache der septischen Granulomatose festgestellt wurde, ein willkommenes Hilfsmittel, um das Vorliegen dieser Krankheit sicher zu diagnostizieren.

Park und Mitarbeiter (22) erweiterten 1968 die Anwendung des NBT-Tests. Sie überprüften das Verhalten der Granulozyten gegenüber NBT ohne gleichzeitig einen Reiz durch phagocytierbares Material zu setzen.

Es zeigte sich, daß eine beschränkte Zahl von Granulozyten auch unter diesen Bedingungen Formazan bildete. Bei gesunden Erwachsenen lag der Prozentsatz an NBT-positiven Zellen bei durchschnittlich 8 %. Der Prozentsatz war stark erhöht, wenn die Probanden an bakteriellen Infektionen litten. Bei viralen Infektionen blieben die Werte dagegen im Normbereich. Damit hatte man einen einfachen klinischen Test in der Hand, um bakterielle Infektionen von viralen zu unterscheiden. Es ergab sich, daß dieser Test bei Erwachsenen und Kindern ab einem Alter von etwa acht Wochen durchführbar ist, bei Säuglingen unter zwei Monaten wurde er dagegen als nicht anwendbar befunden, da er "falsch positive" Werte, d. h. im Vergleich zum Erwachsenen erhöhte Werte zeigt, ohne daß eine bakterielle Infektion vorliegen muß.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Verhältnissen bei Früh- und Neugeborenen weiter nachzugehen. Insbesondere war es von Interesse festzustellen, ob trotz der sowieso hohen Basiswerte bei bakteriellen Infektionen eine weitere Erhöhung oder eine sonstwie geartete Veränderung feststellbar ist, und wie rasch sich diese gegebenenfalls entwickelt. Dazu war es notwendig, in Verlaufsuntersuchungen den NBT-Test laufend in ein- bis dreitägigen Abständen durchzuführen, um im Falle des Eintretens einer bakteriellen Infektion dies von Anfang an mit zu erfassen.

Bakterielle Infektionen und gerade auch die gar nicht so seltene bakterielle Sepsis machen bei Frühgeborenen kaum klinische Erscheinungen, sodaß es äußerst wert-

voll wäre, wenn man einen einfach anwendbaren Test zur Prüfung der Situation hätte. Als verlässlichstes Kriterium des Verdachts auf Sepsis beim Neu- und Frühgeborenen gilt bisher die Entwicklung einer Thrombozytopenie. Untersuchungen von Cocchi und Mitarbeitern haben die Hoffnung erweckt, daß der NBT-Test bei der Diagnose einer Sepsis bei Frühgeborenen nützlich sein könnte. Es wurde daher der Ausfall des NBT-Tests bei 25 normalen Neugeborenen, 32 Frühgeborenen und 10 Kindern mit Sepsis über einen längeren Zeitraum verfolgt.

M A T E R I A L:

NBT = Nitroblautetrazoliumchlorid wurde von der Firma Serva, Feinbiochemica, Heidelberg bezogen. Nach den Angaben von Park (22) wurde für den Test eine Mischung von gleichen Teilen 0,2 %igen NBT in physiologischer Kochsalzlösung und 0,15 M Phosphatpufferlösung von p H 7,2 verwendet. Es wurden meist folgende Mengen angesetzt:

1. 20 mg NBT auf 10 ml physiologischer Kochsalzlösung

2. Isotoner Phosphatpuffer:

Lösung A: $0,15 \text{ mol NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O} = 23,4 \text{ g/l}$

d.h. 1,17 g / 50 ml

Lösung B: $0,15 \text{ mol Na}_2\text{HPO}_4 = 21,3 \text{ g/l}$

d.h. 1,065 g / 50 ml

Lösung A: 12 ml

Lösung B: 38 ml

Es stellte sich heraus, daß die Haltbarkeit des NBT-Phosphatpuffergemisches besser war, als die der einzelnen Lösungen. Es wurden also 10 ml NBT-Lösung und 10 ml Pufferlösung in einem verschlossenen Glasgefäß im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lösung war mindestens 2 Wochen verwendungsfähig und mußte nicht jeden Tag neu hergestellt werden. Die Lösung wurde nur als verwendungsfähig angesehen, solange sie klar und ohne Niederschlag war.

Nach Möglichkeit verwendete ich venöses Blut und bat deswegen auf den Stationen die Ärzte und Schwestern, mir bei Blutentnahmen im Rahmen der Routineuntersuchungen eine Probe mit abzunehmen, damit die Kinder wegen der geringen Menge die benötigt wurde, nicht nochmals gestochen werden mußten. In manchen Fällen wurde auch Blut verwendet, das durch Hautstich aus der Ferse ("Kapillarblut") gewonnen wurde.

M E T H O D E :

Die Methode von Park (22) wurde etwas abgewandelt und ausgeführt wie folgt:

1. Abnahme von Blut, entweder venös mit einer Spritze oder "Kapillarblut" mit Hämostillet und Abfüllung in ein heparinisiertes Hämatokritröhrchen. Das Blut wurde im allgemeinen sofort verarbeitet, gelegentlich ergaben sich jedoch Wartezeiten bis zu drei Stunden während derer das Blut im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Eine Kontrolluntersuchung an neun verschiedenen Blutproben ergab, daß eine solche Wartezeit keinen maßgeblichen Einfluß auf das Ergebnis hatte (Tabelle 2).
2. Das Blut, das in den heparinisierten Röhrchen ungerinnbar war, wurde nun mit einer gleichen Menge (zwei Tropfen = 1 HK-Röhrchen) NBT-Phosphatpufferlösung in einem Eppendorfhütchen zusammen gebracht, vorsichtig, um Beschädigung an Zellen zu vermeiden, umgerührt, und 15 Minuten im Brutschrank oder im Wasserbad bei 37 ° C aufbewahrt. Die von Park (22) zu diesem Zwecke verwendeten Tüpfelplatten schienen uns weniger zweckmäßig zu sein, unter anderem wegen der Gefahr der Austrocknung und des umständlichen Reinigungsprozesses. Da die Eppendorfhütchen verschlossen werden konnten, bestand kaum Gefahr der Eintrocknung. Vergleich zwischen einfachem Einstellen in den Brutschrank und Einstellen in das Wasserbad ergaben gleiche Werte. Anschließend wurde die NBT-Blut-Lösungsmischung nochmals vorsichtig umgerührt und 15 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt.
3. Von dem inkubierten Blut wurden Blutausstriche gemacht, luftgetrocknet und meist nach 24 Stunden mit Wright-Lösung gefärbt.

Färbemethode: Auf der Färbebank wurden die Objektträger mit Wright-Lösung übergossen und nach 3 Min.,

eine Minute lang Aqua dest. hinzugegeben. Danach wurden die Objektträger unter fließendem Wasser abgeaschen und die Rückseite mit Zellstoff abgerieben.

4. Unter Ölimmersion wurden die Leukozyten gezählt und zwar an mehreren Stellen des Ausstrichs. Als NBT-positiv wurden nur die Granulozyten mit eindeutig dichtem schwarzen Niederschlag gewertet. Es war auffällig, daß die NBT-positiven Zellen nicht mehr die klare Struktur der Zellkerne erkennen ließen, wie solche, die kein NBT phagozytiert und in Formazan umgewandelt hatten. In Zweifelsfällen wurden die Zellen weder als positiv noch als negativ gewertet, d. h. aus der Auswertung heraus gelassen.

Um eine subjektive Beurteilung einzuschränken, wurden die Objektträger entweder nummeriert oder nur mit ein oder zwei Buchstaben des Namens gekennzeichnet. Anhand des Datums konnte mit dem Protokoll verglichen werden. So wußte ich in den wenigsten Fällen, wessen Blut ich vor mir hatte. In einer gesonderten Untersuchung verglich ich jeweils zwei Präparate des gleichen Blutes miteinander (s. unten).

Nach verschiedenen Zählungen von 50, 100, 500 Zellen zeigte sich, daß 100 Zellen genügten (22).

Versuche mit verschiedenen Färbemethoden wie z. B. HE-Färbung, Erythrosin, Fixierung der Ausstriche mit Alkohol etc. ergaben, daß obige Methode im Durchschnitt die besten Ergebnisse brachte, wenn die Wright-Lösung nicht zu alt oder verschmutzt war.

Zur Überprüfung der Objektivität des Auszählens wurden "Blindversuche" durchgeführt: von insgesamt 16 verschiedenen Testpersonen wurden jeweils zwei Ausstriche gemacht. Eine Hilfsperson versah die Ausstriche mit wahllos herausgegriffenen

Abbildung 3

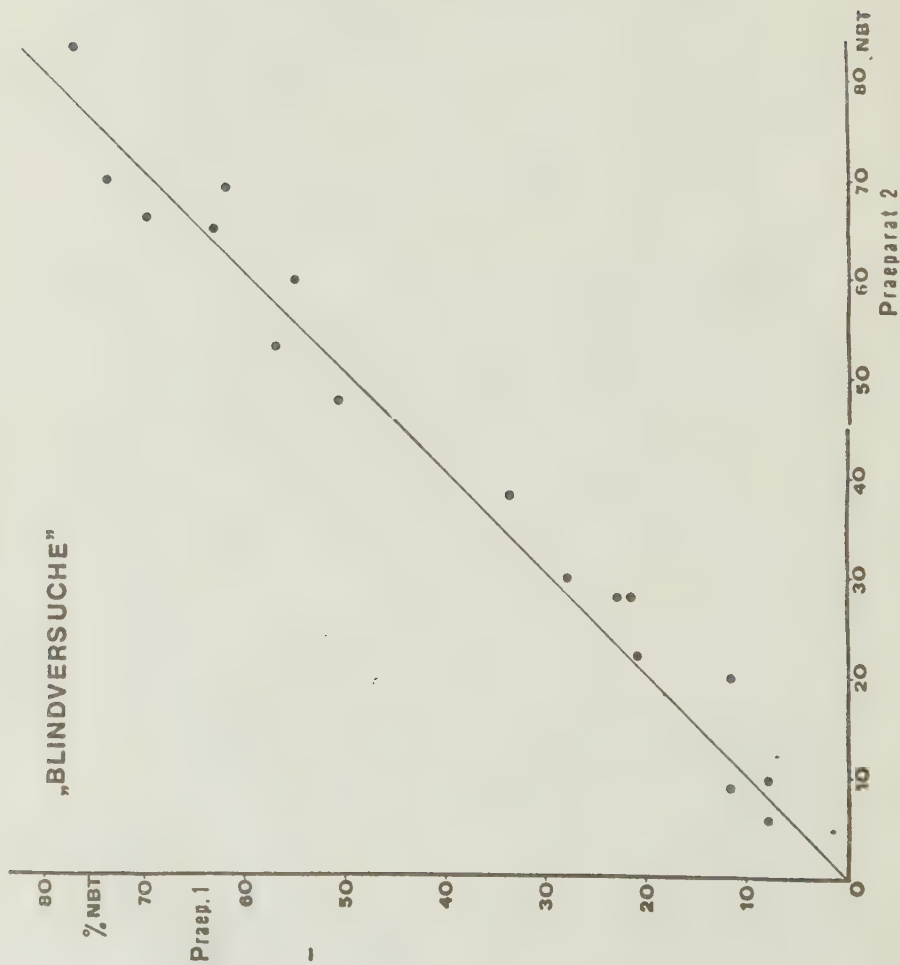
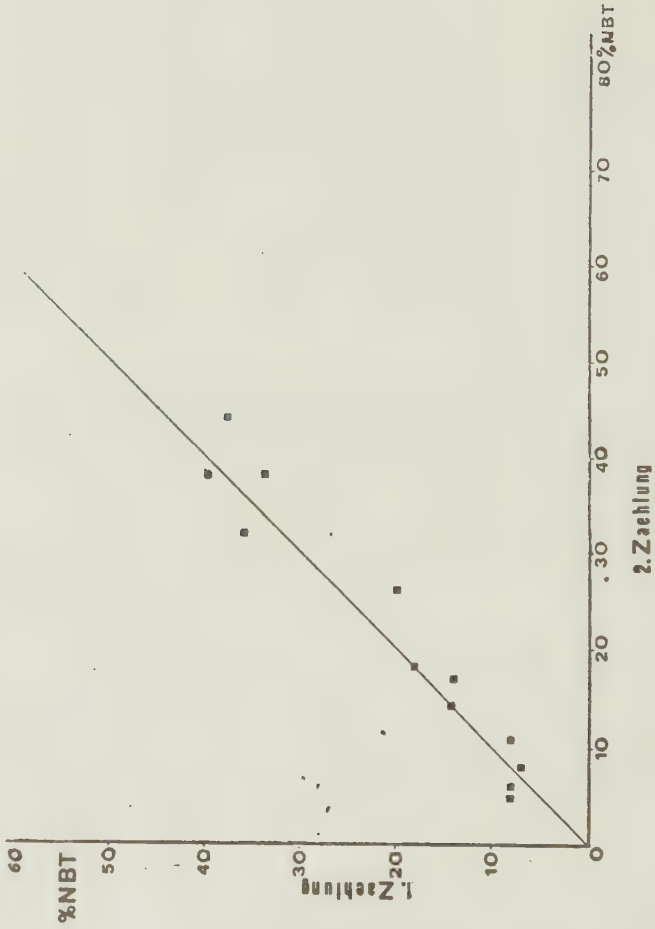


Abbildung 4 : Kontrolle alter Präparate



Die Standardabweichung betrug hier 1,73.

Außerdem ist zur Methode zu bemerken, daß fast alle Auswertungen erst am Schluß, nach Abschluß der Versuche, vorgenommen wurden, das Auszählen also nicht durch irgendwelche beabsichtigten Ergebnisse beeinflusst wurde.

Um festzustellen, wie lange das Blut verwertbar war, wurde bei einigen Blutproben der Test mit Frischblut, dann nach ein, zwei und drei Stunden durchgeführt. Es zeigte sich, daß der Prozentsatz nach einer Stunde im Durchschnitt um 3 % (Relativprozent), nach zwei Stunden um 4,5 % und nach drei Stunden um 5,5 % niedriger war, d. h., daß die Proben zwar nach Möglichkeit frisch sein sollten, aber auch bis zu drei Stunden eine Aussage möglich machen, da die Werte für Patienten mit bakteriellen Infektionen und die der gesunden Patienten weiter auseinander liegen. (s. unten)

Zur Demonstration dieser Ergebnisse dient die Tabelle 2.

Tabelle 2

Auszählungen von Frischblut und Blut, das nach 1, 2 und 3 Stunden nach Abnahme und Aufbewahrung im Kühlschrank mit NBT-Lösung inkubiert wurde.

Probe Nr.	Frischblut	1 Std.	2 Std.	3 Std.
1	36	38		
2	14	12	12	
3	22	22	18	18
4	18	17	12	
5	19	20	25	26
6	15	11	11	11
7	42		48	40
8	18		16	
9	20		18	

ERGEBNISSE:

Von 107 Kindern und 25 gesunden Erwachsenen wurden 443 Präparate ausgezählt. Die Erwachsenenwerte schwankten zwischen 2 und 18 und ergaben einen Durchschnitt von 8,7 %.

Die Kinder wurden, um Vergleichswerte ermitteln zu können, in verschiedene Gruppen aufgeteilt und nach Lebensalter in Wochen verglichen. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Kinder an.

Gruppe 1: Normale Neugeborene (25)

Gruppe 2: Frühgeborene (32)

Gruppe 3: Früh- und Neugeborene mit Sepsis (8)

Gruppe 4: Fg- und Ng mit Atemnotsyndrom (19)

Gruppe 5: Fg und Ng mit Apgar < 7 (17)

Als normale Neugeborene wurden Kinder gewertet, die mehr als 2.500 g Geburtsgewicht und keinen positiven bakteriellen Befund aufwiesen, als Frühgeborene Kinder mit weniger als 2.500 g Geburtsgewicht.

Die Sepsisfälle setzten sich zusammen aus sechs Frühgeborenen und zwei normalen Säuglingen. Eine Sepsis wurde dann angenommen, wenn die Blutkultur ein positives Ergebnis erbrachte.

Die Tabelle 3 zeigt als Übersicht die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen in Lebensalter nach Wochen (1-6) gegeneinander verglichen, sowie die Standardabweichungen, die Zahl der Patienten und der Werte die verwendet wurden. Es besteht die Möglichkeit eines allerdings unvollkommenen Vergleichs, aufgrund der geringen Patientenzahl von Frühgeborenen und Neugeborenen mit Sepsis in den ersten Lebenswochen. Danach wären in den ersten Wochen die Werte bei den Neugeborenen etwas niedriger als bei den Frühgeburten, wie das auch bei den gesunden Kindern der Fall ist.

Tabelle 2

Übersicht über die gewonnenen Werte

a) Zahl der verwendeten Werte
c) Durchschnittswerteb) Zahl der Patienten
d) Standardabweichung

	Normal	Früh	Früh mit Sepsis	Normal mit Sepsis	Apgar	7	Atemnotsyndrom
1. Woche							
a)	35	65	12	1	38		35
b)	22	32	6	1	17		19
c)	34,31	40,16	34,00	48,00	36,50		39,14
d)	15,38	13,26	23,12	0,00	15,10		13,40
2. Woche							
a)	10	39	11	3	31		31
b)	6	17	5		9		10
c)	29,80	38,48	36,72		36,25		35,06
d)	8,86	9,99	10,96		8,80		8,64
3. Woche							
a)	4	20	6	2	9		8
b)	4	13	3	2	6		5
c)	25,75	33,25	36,33	29,00	32,22		36,60
d)	20,88	13,55	21,03	9,89	12,18		14,53
4. Woche							
a)	11	11	7	5	10		7
b)	9	8	3	2	6		5
c)	27,00	27,72	36,42	31,00	27,80		29,14
d)	14,77	9,36	12,35	12,20	8,61		7,38
5. Woche							
a)	5	11	6	2	8		7
b)	4	8	3	2	6		5
c)	22,75	31,81	26,80	26,00	31,37		26,42
d)	9,06	13,25	6,14	2,82	15,62		5,71
6. Woche							
a)	3	6					
b)	3	6					
c)	15,22	20,00					

Abbildung 5

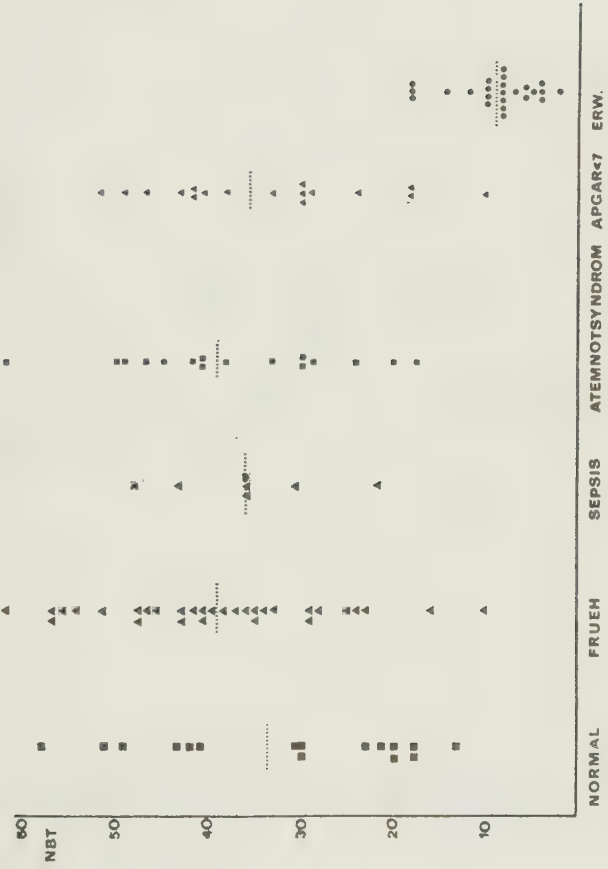


Abbildung 5 zeigt die für die erwähnten Probanden erhobenen Werte in der ersten Lebenswoche der Kinder. Die eingetragenen Werte bei Sepsis entsprechen der ersten Sepsiswoche, d. h. es wurden die Werte am Tage der Abnahme für die Kultur, die dann einen positiven Wert zeigte und bis zu drei Tagen davor und danach gewertet, jeweils ein Mittelwert errechnet und eingezeichnet. Die Erwachsenenwerte sind Einzelwerte. Die gestrichelte Linie entspricht dem jeweiligen Mittelwert der Gruppe.

Wie ersichtlich sind die Erwachsenenwerte wesentlich niedriger als die der Kinder, während bei den anderen Gruppen ein breiter Streubereich ohne sichere Unterschiede vorliegt. Auffällig ist noch, daß der Mittelwert der Frühgeborenen höher liegt als der der normalen Neugeborenen. Um festzustellen, ob eine signifikante Erhöhung der Werte vorliegt, wurde mit der Rechenmaschine Diehl Combitron S der T-Test nach Student durchgeführt und ermittelt, daß in den ersten zwei Lebenswochen eine signifikante Erhöhung vorliegt, danach sind die Werte der Frühgeborenen auch noch höher aber eine Signifikanz ist nicht gegeben. Zum Teil ist dies durch die geringe Patientenzahl bedingt.

Abbildung 6

NET-Durchschnittswerte der verschiedenen Gruppen im Verlauf der ersten fünf bzw. sechs Lebenswochen.

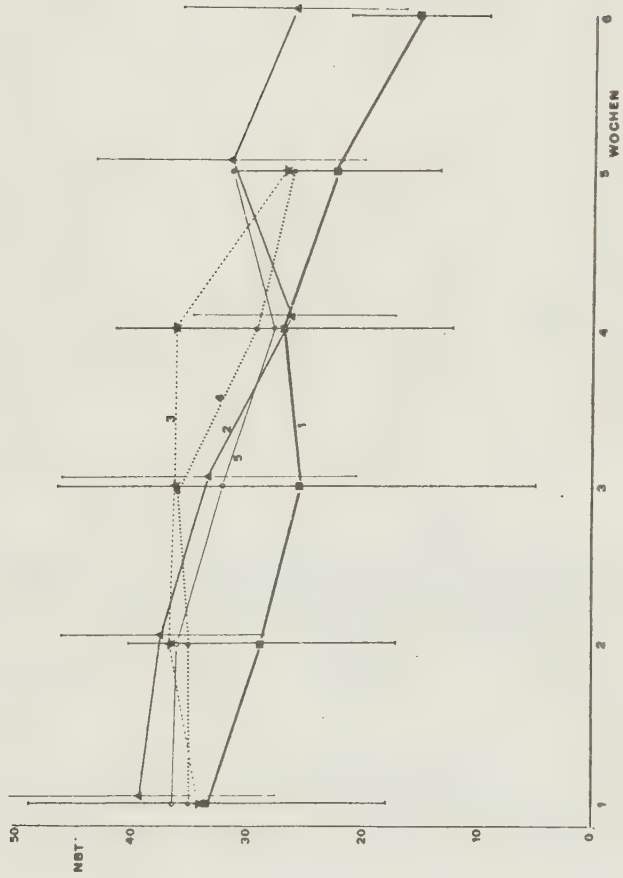


Abbildung 6 zeigt den Verlauf der NBT-Werte von der ersten bis zur fünften, bzw. sechsten Lebenswoche der Kinder. Es wurden Mittelwerte errechnet und dazu die Standardabweichungen bei Frühgeborenen und Normalgeborenen eingezeichnet.

- 1 = Normale Neugeborene
- 2 = Frühgeborene
- 3 = Frühgeborene mit Sepsis
- 4 = Atemnotsyndrom
- 5 = Apgar 7

Jeder Punkt setzt sich aus den ermittelten Werten von mindestens drei Patienten zusammen.

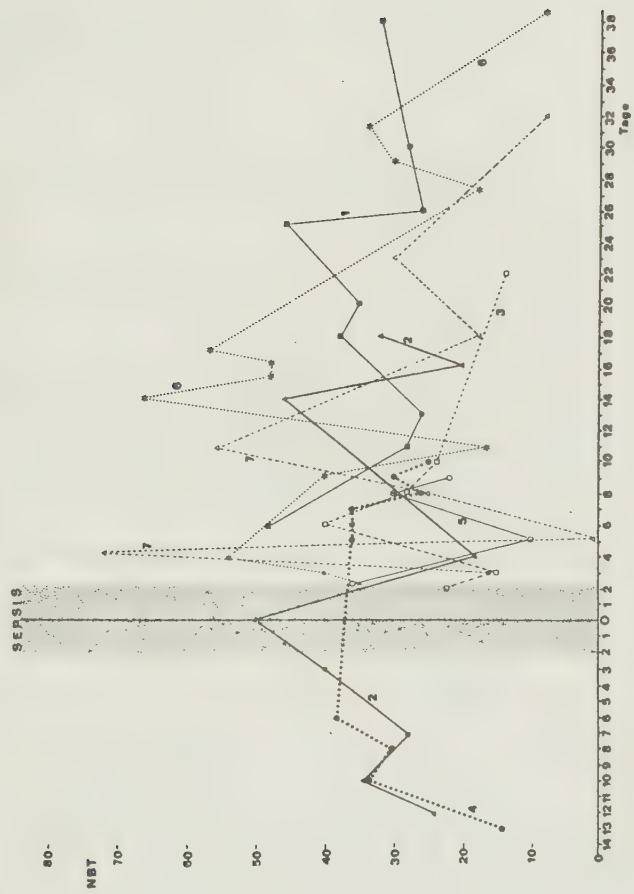
Es ist u. a. ersichtlich, daß bei den Normalgeborenen die Werte bis zur sechsten Woche in den Normbereich (= Werte älterer Kinder und Erwachsener) gehen, die Werte bei den Frühgeborenen dagegen insgesamt höher liegen und langsamer absinken. Die Werte der Kinder mit Sepsis liegen innerhalb der Standardabweichungen der Normal- und Frühgeborenen.

Abbildung 7 zeigt die individuellen Verläufe bei Sepsis von sieben Kindern. Der schraffierte Bereich gibt den Zeitpunkt der Sepsisdiagnose $\pm$ zwei Tage an.

Wie man sieht, schwanken die Werte sehr stark und zeigen keine irgendwie erkennbaren einheitlichen Reaktionen auf Sepsis.

Auffällig ist, daß zwei Frühgeborene (Nr. 2 und 4) mit auffallend niedrigen Werten anfangen. Beide wogen bei der Geburt 1000 g.

Abbildung 7
Sepsisverläufe



Klinische Daten der dargestellten Sepsisfälle:

- 1 = (R. F.) Proteusmeningitis und -sepsis; war anbehandelt
zum Zeitpunkt des ersten Tests.
Entwicklung eines Hydrocephalus als Folge der
Meningitis
Normalgeburt
Zum Zeitpunkt der Sepsisdiagnose 6 Tage alt
- 2 = (Da.) Klebsiellen und Proteussepsis; Die Sepsis ent-
wickelte sich in der dritten Lebenswoche;
Frühgeburt, 1000 g 28. SSW
1. Test am 4. Lebenstag, Sepsisdiagnose am
16. Lebenstag
- 3 = (G. J.) Pseudomonassepsis, Entwicklung in der dritten
Lebenswoche (Diagnose am 20. Lebenstag)
Normalgeburt
- 4 = (Gre.) Streptokokkensepsis am 22. Tag
Frühgeburt, 1000 g 28. SSW, pp. Asphyxie
1. Test am 4. Lebenstag
- 5 = (Ki) Staphylokokkensepsis, laterale Bauchspalte,
Exitus einen Tag nach letztem Wert
Frühgeburt, 2000 g
3 Tage alt, einen Tag vor dem Wert 10 100 ml
Frischblut erhalten
- 6 = (Mart.) Klebsiellensepsis; am 5. und 7. Lebenstag
positive Blutkultur
Frühgeburt 1200 g
- 7 = (Tap.) Colisepsis, Infekt der Mutter;
Frühgeburt, 2000 g Sepsis ab 1. Lebenstag
Antibiotika ab 1. Lebenstag

Von Fall 8 wurde keine Graphik angefertigt, da einmal die
Zeit zwischen den einzelnen Auswertungen zu groß war.

Klebsiellensepsis; Exitus nach letztem Wert

Werte: 55 %, 12 Tage Pause, 22 %, 31 %

Frühgeburt 1100 g

Sieben Tage nach dem Wert von 74 % positive Blutkultur.

Außerdem wurden noch zwei ältere Patienten mit Sepsis unter-

sucht. Ein Kind mit einer Candidasepsis, das ein halbes Jahr alt war, hatte die Werte 38 und 60 % NBT, also deutlich erhöht. Ein anderes Kind zwei Jahre alt mit Verbrennungen und einer konsekutiven Staphylokokkensepsis zeigte die Werte 38, 46, 40, 36, 8, 8, 8, 12; bei dem Wert von 46 war die Blutkultur positiv, allerdings auch noch bei dem ersten Wert 8.

NBT-Test bei Verbrennungen

Weitere Untersuchungen wurden an Patienten mit Verbrennungen durchgeführt. Hierbei ergab sich am ersten Tag, in einem Fall am zweiten Tag ein Anstieg der Werte bis auf 72 %. Im Durchschnitt war am ersten Tag ein Wert von 37 %, am zweiten Tag 60 % NBT-positive Zellen zu beobachten. Nach einer Woche sanken die Werte wieder in den Normalbereich ab. Nur in einem Fall lag eine Sepsis (Fall 2) vor. Die Werte bewegten sich etwa im Rahmen der übrigen. Außerdem ist zu diesem Fall zu bemerken, daß das Kind nach der positiven Blutkultur Antibiotika erhielt und an einem Tag einen Wert von 8 % hatte, obwohl die Blutkultur noch positiv war.

Eine Übersicht über die gewonnenen Werte gibt Tabelle 4.

Tabelle 4

Verbrennungen und Verbrühungen

Tag nach Verbrennung	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. D.Ch., 2 Jhr. 2. 0 12 - 15 % Verbrennung				40		50							14									
2. B.A., 2 Jhr. 2. 0 46 % Verbrühungen Sepsis				38	46	40					36	8	8	8								
3. St. 1 Jahr 2. - 3. 0 8 - 9 % Verbrühung		9	72		41											40					13	
4. Fl., 5 Jhr. ca. 25 % Verbrühung		35			60					18						22		7				
5. Str., 4 Jhr. 2. 0 45 % Verbrühung			48	58	54	28			16				6									8
6. Hö. 1 Jahr 2. - 3. 0 18 % Verbrühung		67		20		34					30											30
Wochendurchschnitt:				43,5							16								14,5			

DISKUSSION:

Von Baehner und Mitarbeitern (2,3) wurde ursprünglich der NBT-Test zur Funktionsanalyse der neutrophilen Granulozyten eingeführt, und zwar speziell zur Diagnose der sogenannten septischen Granulomatose. Sie zeigten, ebenso wie Windhorst und Mitarbeiter (29), daß während in vitro Phagozytose die Fähigkeit von normalen menschlichen Leukozyten, den NBT-Farbstoff zu reduzieren, wesentlich erhöht war; Leukozyten von Patienten mit septischer Granulomatose phagozytieren zwar, aber reduzieren kein NBT.

Die in den eigenen Untersuchungen eingesetzte Modifikation des Tests hat einen anderen Sinn: Park und Mitarbeiter (23) benutzten den Test als Diagnostikhilfe zur Differenzierung von bakteriellen und viralen Infektionen, indem sie unstimulierte Leukozyten untersuchten.

Venöses Blut wurde mit der NBT-Lösung eine halbe Stunde inkubiert. In den danach hergestellten Ausstrichen wurden 100 Neutrophile ausgezählt und der Prozentsatz an NBT-positiven Zellen ermittelt. Als positiv wurden solche Zellen bezeichnet, die einen dichten schwarzen Niederschlag von reduziertem NBT-Formazan enthielten. Die Autoren ermittelten bei gesunden Erwachsenen einen durchschnittlichen Prozentsatz von 8,5 % NBT-positiven Zellen. Die eigenen Ergebnisse stimmen damit gut überein, wie aus der weiter unten folgenden Tabelle 6 zu ersehen ist. Bei bakteriellen Erkrankungen war der Prozentsatz dieser Zellen stark erhöht und ergab Werte von 29 - 47 %. Diese Werte kehrten nach Abheilung wieder in den Normbereich zurück. Bei Systemerkrankungen, viralen Erkrankungen, sowie Patienten mit Primärtuberkulose wurden Werte innerhalb des Normbereiches gefunden, hier spielen nach Park die Leukozyten keine große Rolle in der Abwehr. Es ergibt sich also die Möglichkeit, mit Hilfe dieses Tests, bakterielle Erkrankungen von nichtbakteriellen zu unterscheiden.

Der NBT-Test ist ein relativ einfach durchzuführendes Verfahren. Der Zeitaufwand für einen Test beträgt mit Auswertung etwa eine Stunde. Als Bedingung wäre zu fordern, daß er einige Male an Kontrollpersonen geübt werden sollte, damit der Untersucher Erfahrung im Erkennen der NBT-positiven Zellen gewinnt. Der Test sollte auch nach Möglichkeit immer von dem selben Untersucher durchgeführt werden, damit objektive Vergleichsmöglichkeiten zu vorhergegangenen Auswertungen gegeben sind.

Der Materialaufwand ist gering, wenn die Lösungen für einen längeren Zeitraum (maximal 2 Wochen) angesetzt werden. Es können dann bei dem geringen Bedarf dieser Lösung mehrere Tests durchgeführt werden. Nach den gemachten Erfahrungen ist es möglich, daß ein Untersucher parallel etwa 4 - 5 Test durchführt, ohne zeitlich in Schwierigkeiten zu geraten (z.B. beim Färben).

Humbert und Mitarbeiter (18) untersuchten Patienten mit und ohne Infektionen und fanden bei 83 % der Patienten mit bakteriell bedingten Erkrankungen einen erhöhten Prozentsatz an NBT-positiven Zellen. Der Test ist also, wie dieses Ergebnis zeigt, nicht 100 %ig zuverlässig. Sie stellten weiter fest, ebenso wie Park (23, 24, 25), daß gesunde Kinder unter zwei Monaten spontan hohe Werte zeigten, ohne bakterielle Infektionen zu haben, also "falsch positive" Werte erbrachten. Als Durchschnittswert fand die Gruppe bei gesunden Erwachsenen 7,7 % NBT-positive Zellen mit einer Streuung von 1 - 15 %, bei Patienten mit bakteriellen Infektionen 27,7 %. Allerdings hatten 10 von diesen Patienten Werte im Normalbereich, zeigten also falsch negative Resultate, ebenso wie Patienten mit viralen Infektionen. Humbert empfiehlt den Test als zusätzliches Mittel zur Diagnose akuter bakterieller Infektionen, besonders bei ambulanten Patienten.

Erhöhte Werte bei Neugeborenen wie sie Park (23) und Humbert (18) gefunden hatten, stellten auch Cocchi (6) und Mitarbeiter in ihren Untersuchungen fest. Sie fanden bei normalen gesunden Neugeborenen Durchschnittswerte von 36,1 %, bei gesunden Frühgeborenen 25,5 %, Frühgeborenen mit bakteriellen Infektionen 3,2 %, Frühgeborenen mit nicht bakteriellen Infektionen 25,8 %. Bei Frühgeborenen mit bakteriellen Erkrankungen war also die NBT-%-Zahl absolut und relativ reduziert. Bei einigen davon, mit schweren bakteriellen Infektionen registrierten sie eine Leukozyte in Verbindung mit einer Schwäche der NBT-Reduktion. Weiterhin zeigten sie, daß bei Verschlechterung des Zustandes und Gewichtsverlust eine beträchtlich niedrigere NBT-Reduktion vorlag, die sich bei Besserung wieder erhöhte.

Die erhöhten Werte bei Neugeborenen waren Gegenstand der Untersuchungen einiger Arbeitsgruppen, darunter auch Park (25), der die Stoffwechselaktivität von Leukozyten untersuchte.

Phagozytose bewirkt bei normalen Leukozyten in erster Linie einen Mehrverbrauch an Sauerstoff, Aktivierung des oxydativen Pentoseweges (sonstige Energiequelle Glykolyse) und Produktion von Wasserstoffperoxyd das zusammen mit den lysosomalen Enzymen verantwortlich für die Abtötung der Bakterien zu sein scheint (4). Nach Rapoport (27) steigt der oxydative Pentoseweg, der auch im Ruhestoffwechsel überwiegt auf das 15-fache an, während der Umsatz über die Glykolyse sich verdreifacht.

Die Aktivität des Hexose-Monophosphat-Weges ist bei normalen Zellen durch die Menge an verfügbarem Glucose-6-Phosphat begrenzt (4). Park fand nun, daß der Sauerstoffverbrauch, NBT-Reduktion und CO_2 Produktion aus Glucose - 1 - Phosphat bei Neugeborenenleukozyten signifikant höher waren als bei Erwachsenen. Geringere Unterschiede bestanden im Glucose-

verbrauch, Laktatproduktion und Inulin-¹¹C Aufnahme. Letztere schwankte stark von Tag zu Tag.

Der falsch positive NBT-Test bei Neugeborenen ist nach Park und Mitarbeiter (25) also auf deren erhöhte Stoffwechseltätigkeit zurückzuführen. Da erhöhte metabolische Aktivität bei normalen Leukozyten mit Phagozytose einhergeht, kann das bedeuten, daß vor dem Geburtsprozess eine Aufnahme von Stoffen stattfindet. Aus einer vermehrten Aufnahme von Inulin-¹¹C schlossen sie auch auf eine vermehrte Pinocytoseaktivität. Es ist auch möglich, daß ein hormoneller Einfluss, der aber nicht bekannt ist, diese Veränderungen bewirkt. In einer anderen Studie fanden Park und Mitarbeiter (24), daß die Neugeborenenleukozyten doppelt so viel Sauerstoff verbrauchen wie Kontrolleukozyten. Im NBT-Test ergaben sich für normale Neugeborene Durchschnittswerte von 38,1 % und ein Absinken in den Normbereich 7 - 20 Tage nach der Geburt. Nach anderen Untersuchungen (18, 23), wie auch den eigenen, dauert es etwas länger, nämlich 4 - 6 Wochen.

Humbert und Mitarbeiter (19) stellten fest, daß nach der Aufnahme von Bakterien aber vor ihrer Abtötung ein Wechsel von Glycolyse zum Pentosephosphat-Weg stattfindet, intrazellulärer Sauerstoffverbrauch und und H_2O_2 Produktion merklich ansteigen und dabei NBT-Reduktion stattfindet.

Der Mechanismus der Reduktion von NBT-Farbstoff zu Formazan im Cytoplasma der Phagozyten ist nicht ganz klar. Da die intakte Zellmembran für den Farbstoff nicht permeabel ist, muß sie wohl verändert werden. Weiter ist Aktivierung von NBT-Diaphorase notwendig, die für den Übergang des Wasserstoffions von reduziertem Pyridin zum Farbstoff verantwortlich ist. Sie scheint in den Granula des Cytoplasmas lokalisiert zu sein. Die Veränderung der Membran und die Diaphorase-freisetzung kann durch die Phagozytose von Bakterien oder von LateXpartikeln induziert werden, ebenso wir-

ken Endotoxin, Staphylokokkenprotein A und Sterptolysin O, d.h. einzelne Bakterienbestandteile zeigen auch diesen Effekt.

Nach Aufnahme eines Partikels wird die Digestion dadurch eingeleitet, daß sich die primären Lysosomen dem Phagosom nähern und sich an dieses anliegen. Nach Fusion beider Membranen entsteht eine Kommunikation zwischen Phagosomen und Lysosomeninhalt. Enzyme und bakterizide Substanzen werden an das Phagosom abgegeben und dadurch die Digestion eingeleitet. Bei der septischen Granulomatose besteht nun eine Anomalie der Lysosomenmembran, die Fusion von Lysosomen und Phagosomen ist gestört, deshalb können die Leukozyten von Patienten mit diesem Leiden Bakterien zwar aufnehmen aber nicht abtöten (12). Der NBT-Test ist bei ihnen negativ, d.h. NBT wird nicht reduziert. Selbstverständlich bleibt der NBT-Test bei der septischen Granulomatose auch negativ, wenn man ihn ohne Phagocytose ansetzt. Es kann also auch mit Hilfe der einfachen Modifikation von Park (22) das Vorliegen einer solchen Krankheit diagnostiziert werden. Verschiedene Autoren untersuchten die Brauchbarkeit des Tests in verschiedenen Situationen, so fand Anderson (1) bei Patienten mit Malaria erhöhte Werte, ebenso Chretien (5), dieser stellte auch vermehrte NBT-Reduktion bei Loiasis, Trichinosis und Amöben fest. Das schränkt den Wert des Tests etwas ein, jedenfalls in Gegenden in denen diese Parasiten vorkommen. Bei Infektionen der Haut bleiben die Werte im Normbereich (11).

Von Bedeutung ist noch die Tatsache, daß nach wirkungsvoller antimikrobieller Therapie die Werte bald in den Normbereich zurückkehren, ohne daß das Heilung bedeuten würde, sie dagegen bei Anwendung von wirkungslosen Antibiotika erhöht bleiben (10, 14, 20).

Die folgende Tabelle 5 zeigt einige Beispiele über den Verlauf des NBT-Tests in Abhängigkeit von antibiotischer

Tabelle 5

Einige Beispiele über den Verlauf des NBT-Tests in Abhängigkeit von antibiotischer Behandlung

Beispiele:

1. + 42 . 52, 36*, 48, 36, 44, 30	
2. + 52, 30 . . . 52*	
3. + 38 . . 44 . . 24*	
4. + 24 . . . 34 28* 40 . . 50+x . . . 18*, 46, 20 Sepsis	
5. + 14 . . . * . . . 34 . . 30 . . 38 +x 36, 36, 26 . . . 30*	
. . . . 20 Sepsis	
6. + 50, 46, 36, 60 . 46, 42, 52, 44 . 46 42 . . . *	
7. + 38, 46 . 40 . . . x 36 x 8, 8, 8 . . . * . . . 12 2 Jahre alt, Verbrennung	
Staphylokokkensepsis	
8. + x 35, 40, 54 40 . . 18 . . . 66, 48 . . 48 . . 57 *	
. . . 18 Sepsis	

Zeichenerklärung:

+ = Beginn der Antibiotikabehandlung

. = Tag

* = Ende der Antibiotikabehandlung

x = positive Blutkultur

Behandlung. Auch hier zeigen sich bei den Säuglingen Abweichungen gegenüber dem Verhalten älterer Kinder und Erwachsener. Die Werte schwanken zwar, werden aber nur unwesentlich niedriger, soweit eine Beurteilung bei der geringen Zahl der Patienten erlaubt ist.

In den vorliegenden Fällen von Sepsis erhielten die Kinder Antibiotika, meist Anabactyl und Refobacin, deren Wirkung durch das Antibiotogramm geprüft wurde. Bei einem zwei Jahre alten Patienten mit Verbrennungen, die Nummer 7 in Tabelle 5, wurde auch ein Absinken der Werte beobachtet. Das Kind hatte 8 % NBT-positive Zellen trotz positiver Blutkultur. Bei den anderen Fällen war jedoch keine eindeutige Änderung der Werte festzustellen. Dies könnte aus den Ausführungen über die Abhängigkeit vom Stoffwechsel, der bei Neugeborenen erhöht ist, erklärbar sein. Einige Beispiele sind in der Tabelle 5 dargestellt.

Corticosteroide und Phenylbutazon senken die quantitative und qualitative NBT-Reduktion (10, 20, 21). Bei Durchführung des Tests ist also die Applikation dieser Medikament zu berücksichtigen.

Die eigenen Untersuchungen bestätigen weitgehend die zitierten Ergebnisse anderer Autoren. Die Tabelle 6 zeigt einen Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen verschiedener Autoren.

Es zeigt sich, daß grundsätzlich Übereinstimmung darüber besteht, daß Erwachsene mit bakteriellen Infektionen höhere Werte haben als gesunde Erwachsene und daß ebenso Neugeborene erhöhte Werte aufweisen. Die bei den verschiedenen Autoren feststellbaren Abweichungen voneinander fallen demgegenüber nicht ins Gewicht. Entscheidend ist die Relation der Werte gesunder Patienten zu infektiösen Patienten einerseits und zu Kindern unter sechs bis acht Wochen andererseits. Eine Spanne ist hier klar ersichtlich. Die Durchschnittswerte bei gesunden Erwachsenen liegen zwischen 2 und 8,75 %, eigene Ergebnisse 8,5 %. Bei Erwachsenen mit bakteriellen Infek-

Tabelle 6

Autoren		Erwachsene % NBT	Erw. mit Infektion	Neuge- borene	Frühge- borene	Frühgeborene mit Sepsis
Andersen	(1)	2,0 (0-9)				
Chretien	(5)	7	31			
Cocchi	(6)			36,1	25,5	3,2
Cocchi	(7)	3,5		16,1	18,8	2
Doves	(10)	8	46			
Feigin	(13)	8,75 (2-17)	41,3 (6-71)			
Feigin	(14)	3				
Humbert	(18)	7,7		34,1		
	(19)	(1-15)	27,7	(6-69)		
Matula	(20)	3,0 (0-10)	23,8 (3-59)			
Park	(23)	8,5	29-47			
	(24)	(3 -10)	(12-70)	38,1		
eigene Untersuchungen		8,7 (2-18)	41	33,6	39,2	34

tionen zwischen 23,8 und 46 %, also eindeutig höher. In diesem Bereich bewegen sich auch die gewonnenen Werte von Früh- und Neugeborenen. Normale Neugeborene haben zwischen 16 und 38,1 % NBT-positive Zellen, Frühgeborene zwischen 18 und 39,2 %. In Bezug auf die Frühgeborenen besteht eine Differenz zwischen den Ergebnissen von Cocchi und den eigenen: Gesunde Frühgeborene hatten bei uns höhere NBT-Werte als gesunde Neugeborene, während dies bei Cocchi umgekehrt war. Besonders auffallend sind jedoch die Ziffern bei Sepsis solcher Kinder. Bei Cocchi hatten Frühgeborene mit Sepsis Werte von 2 bzw 3,2 %, während in den eigenen Untersuchungen die Werte bei 34 % lagen. Von Cocchi liegen die einzigen mir bekannten Untersuchungen über Frühgeborene mit Sepsis vor. Untersuchungen von fünf Frühgeborenen, nach Tagen der Krankheit, brachten bei ihm folgende Ergebnisse:

Tage:	0	6	12	18	24
in %:	32,8	13,6	3,4	5,6	29,4.

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen Cocchi's und den meinen kann zunächst nur festgestellt werden. Da die Werte bei gesunden Neugeborenen einander recht ähnlich sind, kann keine große Abweichung der Methoden vorliegen. Unterschiede können in der Art der Patienten und evtl. der Art der Erreger der Sepsis bestehen was sich nicht überprüfen läßt. Aufgrund der geringen Patientenzahl auf beiden Seiten (Cocchi 5 Frühgeborene, eigene 6 Frühgeborene, 3 Normalgeborene) wird man weitere Untersuchungen abwarten müssen, bevor man endgültig Schlüsse ziehen kann.

Über die Neugeborenensepsis ist viel gearbeitet worden. Eine eingehende Darstellung findet sich bei Gotoff und Behrman (16): Nur das Immunglobulin IgG tritt durch die Placenta, IgA und IgM werden nicht durchgelassen. Deshalb ist der Neugeborene besonders empfindlich gegenüber gram negativen Organismen: Vor allem IgM ist gegen diese Bakterien wirksam. Infektionen des Feten während

der Schwangerschaft sind selten, da nur wenig Bakterien durch die Placenta durchdringen. Dann allerdings findet schon eine intrauterine Produktion von IgM statt (28). Die meisten Infektionen ereignen sich während oder nach der Geburt. Sie stellen bei den sogenannten Risikokindern, d. h. Frühgeborenen, Neugeborenen mit Atemstörungen, operierten Neugeborenen usw., eine große Gefährdung dar. Die Diagnose einer Sepsis ist endgültig nur durch eine positive Blutkultur zu stellen, die sonstigen klinischen Zeichen sprechen nicht sicher für Sepsis, sie sind uncharakteristisch. Es sind z. B. Leukopenie $< 4000/\text{mm}^3$, Leukozytose > 25000 , Thrombopenie $< 150000/\text{mm}^3$. Diese Zeichen unterstützen die Diagnose der Sepsis aber ihre Abwesenheit schließt die Möglichkeit einer Sepsis nicht aus. Insofern ist jede Methode willkommen, die zu einer frühzeitigen Erkennung einer solchen Erkrankung verhelfen könnte. Dies hatte Anlaß zur Überprüfung des NBT-Test gegeben. Leider ist aus den vorliegenden Resultaten der Schluß zu ziehen, daß auch durch prospektive Untersuchungen gefährdeter Neugeborener mit dem NBT-Test die Entwicklung oder das Vorliegen einer Sepsis nicht diagnostiziert werden können.

Z U S A M M E N F A S S U N G :

Mit der von Park und Mitarbeitern (23) ausgearbeiteten Methode des Nitroblautetrazoliumtests ohne gleichzeitige Phagocytose, die von uns geringfügig modifiziert worden war, wurden Blutproben von 25 gesunden Erwachsenen und 107 Kindern untersucht. Die Erwachsenenwerte lagen zwischen 2 und 18 % und waren mit einem Durchschnitt von 8,7 % mit denen der meisten anderen NBT Untersuchern vergleichbar. Anhand von Blindversuchen wurde die Objektivität des Auszählens geprüft. Es ergaben sich Abweichungen von maximal 5 - 7 %.

Die Untersuchungen wurden in den meisten Fällen mit Frischblut durchgeführt. Zur Prüfung der Brauchbarkeit der Methode wurden Blutproben nach 1, 2, 3, 4 Stunden ausgezählt. Nach einer Stunde war der Wert um 3 %, nach zwei Stunden um 4,5 %, nach drei Stunden um 5,5 % (Relativ-%) gesunken. Das Blut war dabei in heparinisierten Kapillarröhrchen mit 2 Tropfen aufbewahrt worden.

Es wurden weiter Tests mit dem Blut von insgesamt 107 Kindern gemacht und diese, nach Gruppen und nach Lebensalter in Wochen aufgeteilt, miteinander verglichen. Diese Gruppen bestanden aus normalen Neugeborenen, Frühgeborenen, Neu- und Frühgeborenen mit Sepsis, Kindern mit Atemnotsyndrom und Kindern die einen Apgar kleiner als 7 hatten. In Übereinstimmung mit den Literaturunterlagen wurden bei Neu- und Frühgeborenen wesentlich höhere Werte (im Mittel 33,6 % bzw. 39,2 %) als bei Erwachsenen festgestellt. In den ersten zwei Lebenswochen sind die Werte bei Frühgeborenen nach dem T-Test von Student signifikant höher als bei Neugeborenen, die Erhöhung besteht in den nächsten vier Wochen weiter, es ist aber keine Signifikanz mehr gegeben.

Die Werte beider Gruppen wichen nicht signifikant von denen von Kindern mit einer bakteriellen Sepsis ab, sowohl beim Vergleich nach Lebensalter in Wochen, als auch im Verlauf der ersten sechs Wochen.

Auch bei Kindern mit Atemnotsyndrom und solchen mit Apgar kleiner als 7 lagen die Werte im Streubereich normaler Kinder.

Untersuchungen von sechs Kindern mit Verbrennungen oder Verbrühungen, die ein bis fünf Jahre alt waren, zeigten, daß in der ersten Woche nach der Verbrennung bei allen erhöhte Werte vorlagen, die nach zwei bis drei Wochen wieder in den Normbereich zurückkehrten.

Behandlung mit wirksamen Antibiotika senkt bei Erwachsenen (10, 14, 20) mit bakteriellen Infektionen nach kurzer Zeit den $\%$ -Satz an NBT-positiven Zellen. Bei Früh- und Neugeborenen konnte dies in den vorliegenden Untersuchungen nicht festgestellt werden. Ein zweijähriges Kind dagegen, das eine Staphylokokkensepsis im Anschluß an eine Verbrennung hatte und antibiotisch behandelt wurde, zeigte allerdings Werte im Normbereich trotz positiver Blutkultur.

Für die Bedeutung des NBT-Tests bei der Untersuchung von Neu- und Frühgeborenen ergab sich, daß er zur Erkennung einer Sepsis im Neugeborenenalter bis sechs Wochen keine nützlichen Informationen liefert.

LITERATURVERZEICHNIS:

1. ANDERSON, B. R.:
 NBT-test in Malaria
 The Lancet 2 317 (1971)
2. BAEHNER, R. L., NATHAN, D. G.:
 Leukocyte Oxydase: Defective activity in Chronic
 Granulomatous Disease
 Science 155, 835 - 836 (1967)
3. BAEHNER, R. L., NATHAN, D. G.:
 Quantitative Nitroblue Tetrazolium test in Chronic
 Granulomatous Disease
 The New England Journal of Medicine 278 971 - 976
 (1968)
4. BOGGS, D. R., WINKELSTEIN, A.:
 White Cell Manual, 1971
 Published by University of Washington, Seattle,
 Washington
 S. 10 - 21
5. CHRETIEN, J. H., GARAGUSI, V. F.:
 NBT-test in parasitic disease
 The Lancet 4 549 (1971)
6. COCCHI, P., MORI, S., BECATTINI, A.:
 NBT-test in premature infants
 The Lancet 1426 - 1427 (1969)
7. COCCHI, P., MORI, S., BECATTINI, A.:
 NBT reduction by neutrophils of newborn infants
 in in vitro phagocytosis test
 Acta Paediat Scand 60 475 - 478 (1971)
8. COCCHI, P., MORI, S., RAVINA, A.:
 Effect of oxygen on a stimulated NBT-test
 The Lancet 823 - 824 (1971)
9. DACIE, J. V., LEWIS, S. M.:
 Practical Haematology, London 1970
 Fourth Edition
 S. 540

10. DOWES, F., R.:
Chinical value of NBT-test
The New England Journal of Medicine 287 822 (1972)
11. EDITORIAL
NBT: a routine test
The Lancet 2909 (1971)
12. ESCHENBACH, C., SEEBACH G.:
Anomalie der Lysosomenmembran von neutrophilen
Granulozyten als Ursache der progressiven septischen
Granulomatose
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 7 16 - 26 (1971)
13. FEIGIN, R. D., SHACKELFORD, P. D., CHOI, S. C.,
FLAKE, K.:
NBT dye test as an aid in the differential
diagnosis of febrile disorders
The Journal of Pediatrics 78 230 - 237 (1971)
14. FEIGIN, R. D.:
NBT-test in the diagnosis of febrile patients
The New England Journal of Medicine 285 Nr. 6
347 - 348 (1971)
15. GIFFORD, R. H., MALAWISTA, S. E.:
A simple rapid micromethod for detecting chronic
granulomatous disease of childhood
Lab. Clin. Med. 75 511 - 519 (1970)
16. GOTOFF, S. P., BEHRMAN, R. E.:
Neonatal Septicemia
The Journal of Pediatrics 76 142 - 153 (1970)
17. HOLMES, B., QUIE, P. G., WINDHORST, D. P.,
GOOD, R. A.:
Fatal granulomatous disease of childhood
The Lancet 4 1225 - 1227 (1966)
18. HUMBERT, J. R., MARKS, M. I., HATHAWAY, W. E.,
THOREN, C. H.:
The histochemical nitroblue tetrazolium reduction
test in the differential diagnosis of acute in-
fectiona
Pediatrics 48 259 - 267 (1971)

19. HUMBERT, J. R., KURTZ, M. L., HATHAWAY, W. E.:
Increased reduction of Nitroblue Tetrazolium
by neutrophils of newborn infants
Pediatrics 45 125 - 127 (1970)
20. MATULA, G., PATERSON, P. Y.:
Spontaneous in vitro reduction of nitroblue
tetrazolium by neutrophils of adult patients
with bacterial infection
The New England Journal of Medicine 285 311 - 317
(1971)
21. MILLER, D. R., KAPLAN, A. B.:
Increased NBT dye reduction in the phagocytosis
of patients receiving prednisone
Pediatrics 45 861 - 865 (1970)
22. MIMBS, J. W.:
Mechanism of NBT-test
The New England Journal of Medicine 287 49 - 50
(1972)
23. PARK, B. H., FIKRIG, S. M., SMITHWICK, E. M.:
Infection and Nitroblue-Tetrazolium reduction
by neutrophils
a diagnostic aid
The Lancet 2 532 - 534 (1968)
24. PARK, B. H., HOLMES, B. M., RODEY, G. E.,
GOOD, R. A.:
NBT-test in children with fatal granulomatous
disease and newborn infants
The Lancet 1 157 (1969)
25. PARK, B. H., HOLMES, B. M., GOOD, R. A.:
Metabolic activities in leukocytes of newborn
infants
The Journal of Pediatrics 237 237 - 241 (1970)
26. PARK, B. H.:
The use and limitations of the nitroblue
tetrazolium test as a diagnostic aid
The Journal of Pediatrics 78 376 - 378 (1971)

27. RAPPOPORT, S. M.:
Medizinische Biochemie
5. Auflage, Berlin 1969
S. 628
28. TRUCKENBRODT, H., SCHWENK, H.:
Die septische Granulomatose eine Funktionsstörung der segmentkernigen Leukozyten
Sonderdruck aus "Archiv für Kinderheilkunde",
Band 183, Heft 4, 299 - 306 (1971)
29. TYMPNER, K. D.:
Die Bedeutung der Immunglobuline (IgM und IgA)
für die Diagnose und Therapie in der Kinderheilkunde
Habilitationsschrift, München 1971
30. WINDHORST, D. B., HOLMES, B. M., GOOD, R. A.:
A newly defined x-linked trait in man with demonstration of the Lyon effect in carrier females
The Lancet 8 737 - 739 (1967)

L E B E N S L A U F :

Name: Steinebach
Vorname: Günter
geboren: 25. Februar 1945
geboren in: Hirsau/Calw
Vater: Josef Steinebach, Beamter
verstorben 1970
Mutter: Käthe Steinebach, geb. Schiffer, Hausfrau
verstorben 1969
Wohnung: 81 Garmisch-Partenkirchen, Loisachstraße 25 a
Ausbildung: 1951 - 1956 Volksschule Friedberg
1956 - 1960 Gymnasium Saulgau
1961 - 1965 Friedrich-Schiller-Gymnasium
Ludwigsburg
Im Frühjahr 1965 Abschluß mit
Abitur
1965 - 1967 zwei Jahre Wehrdienst
SS 1967 Jura in München
ab WS 1967 Medizin in Freiburg
SS 1968 Vorphysikum in Freiburg
WS 1970 Physikum in Freiburg
ab SS 1970 Medizin in München
SS 1973 Staatsexamen

Herrn Professor Bethke danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die freundliche Unterstützung.

Weiter danken möchte ich den Ärzten, Laborantinnen und Schwestern der Universitätskinderklinik München, besonders Herrn Dr. Tor Pong und Herrn Dr. Versmold für die gewährte Hilfe und Ratschläge.

